

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Ralstonia solanacearum* RAZA 2, AGENTE CAUSANTE DEL MOKO DE PLÁTANO EN COLOMBIAElizabeth Álvarez<sup>1</sup>

## RESUMEN

La Marchitez bacteriana o Moko del plátano causado por *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith raza 2 es la enfermedad bacteriana más importante de este cultivo en Colombia. La técnica de BIO-PCR, se utilizó para detectar la bacteria. Inicialmente se colectaron un total de 337 muestras (193 de suelo y 144 de tejido vegetal), provenientes de cultivos afectados en seis regiones productoras de plátano en Colombia. Se extrajo ADN mediante lisis por calor a 29 cepas de suelo y 160 de tejido seleccionadas por su crecimiento en SMSA. Mediante la técnica de PCR, usando los cebadores OLI1 y Y2, se amplificó un fragmento de 288 pb del gen 16S del ADN ribosomal de *R. solanacearum* en 8 cepas de suelo y 98 de tejido. Las 8 cepas de suelo y 64 de tejido, se seleccionaron de acuerdo a su procedencia e identificadas como biovar 1 basados en la producción de ácidos a partir de los disacáridos celobiosa, lactosa y maltosa y la oxidación de los alcoholes dulcitol, sorbitol y manitol. La prueba de patogenicidad en plántulas de plátano 'África' (*Musa* cv. AAB) bajo condiciones de invernadero, mostró que 35 cepas fueron altamente patogénicas, 28 moderadamente patogénicas, 9 tuvieron patogenicidad baja y 1 no fue patogénica. Mediante infiltración en hojas de tabaco, 63 cepas indujeron reacción de hipersensibilidad correspondiente a la raza 2, y 9 cepas indujeron amarillamiento, reacción atípica para esta raza. La técnica de BIO-PCR facilitó la detección del patógeno en suelo y plantas.

## SUMMARY

Bacterial wilt or Moko of plantain, caused by *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, race 2, is the most important bacterial disease of this crop in Colombia. The BIO-PCR technique was used for detecting the bacterium. A total of 337 samples were initially collected (193 from soil and 144 from plant tissue) from affected crops in six of Colombia's plantain-growing regions. Of these, 29 soil and 160 tissue strains were selected for their growth in SMSA medium. DNA was extracted by thermolysis. With primers OLI1 and Y2, a 288-bp fragment could be amplified by PCR, from the 16S gene of ribosomal DNA in 8 soil and 98 tissue strains. The 8 soil and 64 of the tissue strains were selected according to origin and identified as biovar 1 by their production of acids from disaccharides cellobiose, lactose, and maltose, and oxidation of alcohols dulcitol, sorbitol, and manitol. Pathogenicity tests on seedlings of the plantain 'Africa' (*Musa* cv. AAB) under greenhouse conditions showed that 35 strains were highly pathogenic, 28 moderately pathogenic, 9 had low pathogenicity, and 1 was nonpathogenic. For infiltration in tobacco leaves, 63 strains, induced hypersensitivity, and 9 induced yellowing—an atypical reaction for this race. BIO-PCR technique facilitated the detection of the pathogen in soil and plants.

## INTRODUCCIÓN

El Moko del plátano, Madura viche o Ereke causado por *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith raza 2 (Yabucchi *et al.*, 1995 citados por Ito *et al.*, 1998) es la enfermedad bacteriana más importante de este cultivo en Colombia, afectando posiblemente 125.000 familias que dependen directamente del cultivo de plátano y banano. Actualmente a pesar de la divulgación de las medidas preventivas y manejo de la enfermedad continua en aumento, hasta el punto que 95 % de los predios plataneros tiene como mínimo una planta con Moko (Comunicación personal, Galindo, ICA Bogotá 2004).

La técnica de BIO-PCR desarrollada por Schaad *et al.*, (1995) mejora la eficiencia de la detección de células viables de este patógeno especialmente suelo. Esta técnica consistió en el aislamiento de colonias en medio semi-selectivo Sur África (SMSA) (Englebrecht, 1994; Elphinstone *et al.*, 1996 citados por Martins, 2000; Denny y Hayward, 2001) el cual ha demostrado alta sensibilidad y especificidad comparado con TTC (Kelman, 1954) y posterior amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

<sup>1</sup> Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. A.A. 6713 Cali, Colombia.

*R. solanacearum* difiere en el rango de hospedantes que ataca, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas.

Por esta razón, durante las últimas tres décadas han sido utilizadas las razas y los biovares como una clasificación informal a nivel infrasub-específico el cual no se rige por el Código de Nomenclatura de Bacterias. La raza 1 (biovares 1, 3 ó 4), ataca un gran número de plantas, incluyendo batata, tomate y solanáceas en general. La raza 2 (biovares 1 ó 3), afecta plátano, banano y heliconias; la raza 3 (biovar 2), es considerada específica de batata y está asociada a algunas solanáceas; la raza 4 (biovar 4), ataca jengibre y la raza 5, mora (Hayward, 1991).

Este trabajo tuvo como objetivo aislar *Ralstonia solanacearum* a partir de suelo y de tejido afectado de plátano y banano, mediante BIO-PCR utilizando el medio de cultivo SMSA y el cebador específico OLI 1 junto con el cebador no específico Y2. Mediante inoculación en plantas de plátano y reacción de hipersensibilidad en tabaco se identificaron las cepas pertenecientes a raza 2, además se evaluó su agresividad y patogenicidad. Mediante caracterización bioquímica se determinó biovares.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Procedencia de las muestras.** Se procesaron 134 muestras de tejido vegetal afectado (seudotallos, raquis, frutos y rizomas) de plantas de plátano, 7 de banano y 3 de heliconias seleccionadas de plantas que presentaban los síntomas típicos de la enfermedad; 193 muestras de suelo, 2 de malezas y 1 de agua procedentes de fincas afectadas por Moko ubicadas en áreas productoras de los departamentos de Valle del Cauca, Quindío, Antioquia, Caquetá, Meta y Magdalena en Colombia.

**Procesamiento de muestras de tejido vegetal.** Con el fin de extraer la bacteria presente en el tejido, se seleccionaron fragmentos de tejido con presencia de síntomas, los cuales una vez lavados y desinfectados se maceraron en un mortero, acompañados de una solución buffer que contenía Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, con pH 7.6. Esta suspensión se sembró con un asa estéril en cajas Petri con el medio de cultivo semi-selectivo Sur África (SMSA) el cual es una modificación del medio Cloro Trifenil Tetrazolio (TTC).

El medio SMSA contiene peptona 10 g/L, glicerol 5 mL/L, casaminoácidos 1 g/L, agar 18 g/L y los antibióticos polimixin sulfato 100 mg/L (600.000 U), Bacitracin 25 mg/L; penicilina 0.5 mg/L (82,5 U), junto con cloranfenicol 5 mg/L, 2,3,5 cloro trifetil tetrazolio 50 mg/L y cristal violeta 5 mg/L (Englebrecht, 1994; Elphinstone *et al.*, 1996 citados por Martins, 2000 y Denny & Hayward, 2001). Las cajas sembradas con la suspensión, se incubaron por un periodo de 3 a 5 días dependiendo del momento de aparición de las colonias, a una temperatura de 28° C.

**Procesamiento de muestras de suelo.** A partir del suelo tomado alrededor de plantas de plátano afectadas por la bacteria, se prepararon suspensiones adicionando 3.3 g de suelo en 30 mL de buffer TE pH 7.6. Se realizaron diluciones seriadas en buffer TE, luego se tomaron 100 µL de las diluciones 10-1, 10-2 y 10-3 y se sembraron en cajas de Petri con el medio semiselectivo SMSA. Las cajas se incubaron a una temperatura de 28° C por un periodo de 3 a 5 días dependiendo del momento de aparición de las primeras colonias.

**Aislamiento de bacterias.** A partir de las muestras se seleccionaron colonias de bacterias con crecimiento similar a la cepa control CIAT 1008 de *R. solanacearum*, proveniente de Ibagué (Tolima), perteneciente al banco de cepas del laboratorio de patología de yuca.

**Prueba de KOH y oxidasa.** Se seleccionaron colonias de bacterias purificadas pertenecientes al grupo de bacterias Gram-negativas, mediante la prueba de KOH (3 %) colocando una gota de este reactivo en una lámina de vidrio y posteriormente disolviendo en ella una colonia del cultivo puro y metabólicamente activo, de 24 h de crecimiento, considerando positiva la reacción que origina un hilo mucoso al levantar el asa desde la suspensión bacterial.

La prueba de la oxidasa se hizo colocando dos gotas de solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetra metil-p-fenilendiamina, en una tira de papel filtro y posteriormente se frotó una colonia, observando una reacción positiva determinada por el viraje de color en el papel de incoloro a púrpura oscuro entre los siguientes 30 a 60 seg

(Goszczyńska *et al.*, 2000). Para las dos pruebas se incluyó como testigo la cepa CIAT 1008.

**Extracción de ADN y PCR.** Se extrajo ADN genómico a partir de colonias puras con 36 h de crecimiento en agar nutritivo de las cepas seleccionadas (Seal *et al.*, 1999). Se suspendió la colonia en viales con 100  $\mu$ L de agua destilada estéril, calentándolos en baño María a 96° C por 5 min. Posteriormente se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 2 min. y se tomaron 2.5  $\mu$ L del sobrenadante como ADN molde en la reacción de PCR.

El volumen del cóctel de amplificación fue de 9.98  $\mu$ L el cual contenía 1.25X de buffer para Taq polimerasa; 0.012 mM de cada dNTP; 1.87 mM de  $MgCl_2$ ; 0.25 U de Taq polimerasa; 0.16  $\mu$ M de los cebadores OLI 1 (5'GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC3') y Y2 (5'CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT3') (Seal *et al.*, 1999; Martins, 2000).

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador MSJ-Research PTC-100 con el siguiente programa: Denaturación inicial durante 2 min. a 96° C; 50 ciclos de denaturación por 20 seg. a 94° C, apareamiento por 20 seg. a 62° C, y extensión por 30 seg. a 72° C; junto con una extensión final de 5 min. a 72° C (Seal *et al.*, 1999; CIAT 2004). Los productos del PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio 0.1 % y visualizados bajo luz ultravioleta, evaluando presencia de una banda de 287-288 pares bases del fragmento 16S rADN generada por amplificación con el cebador específico OLI 1 y el cebador no específico Y2 (Woese *et al.*, 1983; Young *et al.*, 1991 citados por Seal *et al.*, 1999).

**Determinación de biovares.** Las cepas pertenecientes a *Ralstonia solanacearum* se pueden clasificar en diferentes biovares por su producción de ácido a partir de los disacáridos celobiosa, lactosa y maltosa y la oxidación de los alcoholes sorbitol, dulcitol y manitol, en medio base, para determinar biovares según Hayward (1964) y Denny y Hayward (2001).

El medio base tiene la siguiente composición por litro: 1 g  $NH_4H_2PO_4$ , 0.2 g KCl, 0.2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.0 g Bacto peptona, 3.0 g agar y 80.0 mg azul de bromotimol con pH entre 7.0-7.1 tornándose de color verde oliva. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121° C - 20 lb de presión de 20 a 30 min (Denny y Hayward, 2001). También se prepararon soluciones acuosas al 10% con cada uno de los carbohidratos de prueba y se esterilizaron mediante filtración con filtros Millipore® cuyo tamaño del poro fue de 0.22  $\mu$ m. Esta solución de carbohidratos se agregó al medio base estéril cuando la temperatura estuvo entre 55 y 60° C, obteniendo una concentración final del 1%. Después de mezclar el medio base con cada uno de los azúcares, cerca de 5 mL del medio líquido se agregaron dentro de tubos de cultivo estériles (Denny y Hayward, 2001).

La inoculación de la bacteria se realizó mediante punción hasta  $\frac{3}{4}$  partes del medio utilizando colonias con 24 h de crecimiento en agar nutritivo, se observaron las reacciones después de 1, 3, 7, 14 y 28 días de incubación a 28° C; con el cambio de color de verde oliva a amarillo se evidencia la producción de ácidos a partir de los disacáridos y oxidación de los alcoholes hexosa (Denny y Hayward, 2001).

**Prueba de patogenicidad en plátano.** Las cepas identificadas por PCR como *Ralstonia solanacearum* se inocularon en plantas de plátano 'África' (*Musa* cv. AAB), provenientes de cultivo de meristemos *in vitro*, las cuales fueron transplantadas a los 15 días de edad en bolsas plásticas de 1 Kg de capacidad con mezcla de arena - tierra estéril en una proporción 3:2 y con humidificación permanente durante los siguientes 15 días, garantizando el óptimo desarrollo de la planta.

Las plantas no fueron regadas 24 h antes de la inoculación. Por cada cepa de *R. solanacearum* se inocularon cuatro plantas de plátano de aproximadamente 6 sem de edad mediante inyección al seudotallo con jeringas de 1 mL estériles, cuyo tamaño de la aguja es 27G x 1/2", hasta el centro del seudotallo a una altura de 2 cm desde la superficie del suelo y se inyectaron 0.5 mL de suspensión bacterial con cultivos de bacterias puros con crecimiento previo de 24 h en agar nutritivo, a partir de las cuales se preparó una suspensión en agua deionizada estéril. La concentración de la suspensión se determinó a través de lecturas de absorbancia en espectrofotómetro y se ajustó a 0.1 con una longitud de onda de 600 nm, correspondiente aproximadamente a  $1 \times 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> (He *et al.*, 1983). Como testigo positivo se inoculó la cepa patogénica de *Ralstonia solanacearum* CIAT 1008 y como testigo negativo se inoculó agua estéril. Las plantas inoculadas permanecieron bajo condiciones controladas de

temperatura entre 24°C y 29° C, luminosidad con 13 h de luz aproximadamente y humedad relativa de 80 a 91% los primeros 4 días; posteriormente se redujo la humidificación a 1 h diaria.

Las evaluaciones de severidad se realizaron teniendo en cuenta el desarrollo de los síntomas de marchitamiento, con los cuales se definió una escala visual de 1 a 5, siendo 1 planta con una hoja marchita y 5 planta con cinco hojas marchitas. Para esto se realizaron evaluaciones diarias durante 18 días, a partir del cuarto día, observando la aparición de síntomas como flacidez en las hojas, marchitamiento y estancamiento del crecimiento. Con esta información se calculó el Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE). En trabajos preliminares realizados por CIAT (sin reportar) se encontró que a partir del quinto día es posible evidenciar síntomas de la enfermedad como flacidez y/o marchitamiento de las hojas.

**Prueba de hipersensibilidad.** Se probó la capacidad de las cepas para inducir reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). A partir de cultivos puros se preparó una suspensión en agua deionizada estéril, utilizando colonias con un tiempo de 24 h de incubación en agar nutritivo, cuya absorbencia fue de 0.1 con una longitud de onda de 600 nm, correspondiente a una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> (He *et al.*, 1983). En esta prueba se usaron plantas de tabaco de 8 sem de edad, las cuales se inocularon mediante infiltración de la suspensión bacteriana, inyectando con jeringa de 1 mL en las nervaduras localizadas en el envés de las hojas, permitiendo la distribución de la suspensión en el parénquima de empalizada.

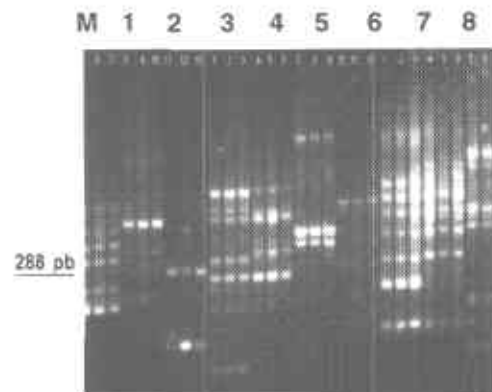
Se inocularon dos hojas por cada planta y dos plantas por cada cepa. La reacción fue evaluada a las 16 h después de la inoculación, observando clorosis en las células afectadas del parénquima y humedad en el tejido limitado por un borde definido del tejido no inoculado. Entre las siguientes 36 y 60 h se evidenció que el área de la hoja infiltrada se vuelve necrótica y seca, debido a la pérdida de agua. Finalmente el área afectada se tornó delgada, blanca y translúcida. Síntomas de hipersensibilidad correspondientes a la raza 2 de *R. Solanacearum* (Lozano y Sequeira, 1970).

**Análisis de datos.** Se hizo análisis de varianza a la variable ABCPE y prueba de separación de medias por Diferencia Mínima Significativa (DMS,  $\alpha=5\%$ ), para separar las cepas en grupos de acuerdo a su patogenicidad.

## RESULTADOS

**Aislamiento de *R. solanacearum*.** A partir de muestras procedentes de seis regiones de Colombia de suelo de cultivos de plátano con Moko y de tejido de plantas de plátano, banano y heliconias afectadas, se seleccionaron 189 cepas de bacterias consideradas inicialmente como *R. solanacearum* por su crecimiento en medio semi-selectivo SMSA, similar al crecimiento del control CIAT 1008, observadas 48 h después de incubación a 28° C; en este medio se redujo el crecimiento de bacterias saprófitas.

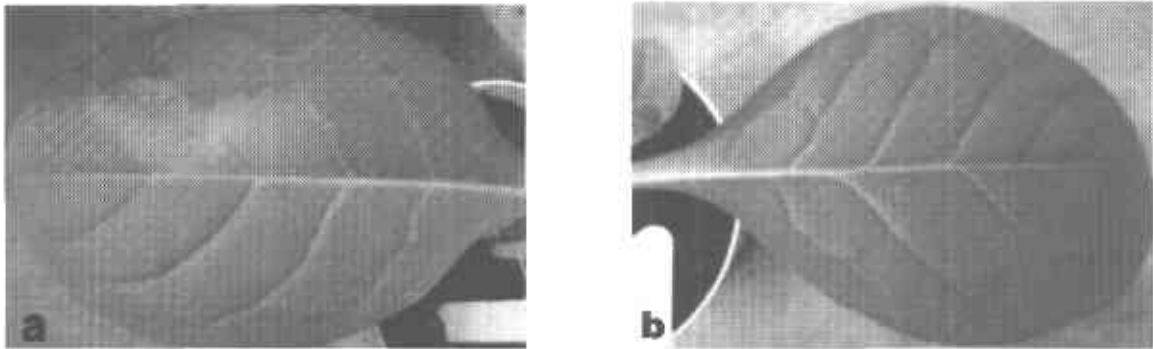
**PCR Análisis.** En un gel de agarosa al 1.5%, se detectó una banda de peso molecular de 288 pb, fragmento ubicado en el gen 16S rRNA, en 106 de los 189 cepas obtenidas, lo que permitió identificarlos como *R. solanacearum* (Figura 1).



**Figura 1.** Producto amplificado con los cebadores OLI 1 y Y2 en la región 16S rRNA de *Ralstonia solanacearum*, de 288 pb. M= marcador 100 pb, carril 1 a 3= cepas de Quindío; carril 4 a 6= cepas de Urabá; carril 7= CIAT 1008; carril 8= control negativo. En la figura se indica la banda de 288 pb, característica de la bacteria

**Determinación de biovares.** La reacción de cada una de las cepas a los azúcares y alcoholes evaluados, indicó que todas las cepas caracterizadas pertenecen al biovar 1, porque no utilizan ninguno de los tres azúcares, ni oxidan los tres alcoholes hexosa de las pruebas bioquímicas realizadas.

**Prueba de patogenicidad y confirmación de Raza 2.** De acuerdo con su procedencia se seleccionaron 72 cepas (8 de suelo y 64 de tejido) positivas a la prueba de oxidasa y KOH. La reacción de hipersensibilidad obtenida en hojas de tabaco indicó que 63 cepas causaron una reacción típica de hipersensibilidad en hojas de tabaco, 48 h después de la inoculación, mientras que nueve cepas indujeron amarillamiento, reacción de hipersensibilidad atípica para esta raza (Figura 2).



**Figura 2.** A. Reacción típica de hipersensibilidad en hoja de tabaco, 48 h después de inoculado con la cepa 111 de *Ralstonia solanacearum* Raza 2. B. Control inoculado con agua destilada estéril

Ocho cepas que mostraron reacción atípica de hipersensibilidad, se obtuvieron de la Costa Atlántica. Setenta y una cepas fueron patogénicas al inocularlas en plantas de plátano, confirmando que pertenecen a la raza 2. Sólo una cepa de Urabá no fue patogénica (Figura 3)



**Figura 3.** Plantas de plátano inoculadas en elseudotallo, bajo condiciones de invernadero. A. Control inoculado con agua. B. Marchitamiento y amarillamiento de las hojas causado por la cepa 85 de *R. solanacearum* raza 2

La prueba de separación de medias, estimada mediante DMS ( $\alpha = 5\%$ ), permitió agrupar las cepas en tres categorías de acuerdo a su patogenicidad (ABCPE). Las cepas de patogenicidad alta indujeron en la planta valores de ABCPE entre 45.13 y 73.38; las cepas de patogenicidad media mostraron valores entre 18.00 y 43.13; mientras que las cepas de patogenicidad baja indujeron valores entre 0 y 15.75. Cinco cepas obtenidas de banano fueron moderadamente patogénicas, mientras que las otras dos mostraron alta patogenicidad. Las tres cepas aisladas de heliconia mostraron patogenicidad media. Por su parte, las cepas aisladas de suelo mostraron diferentes grados de patogenicidad. De rizoma y raquis se obtuvieron cepas de mayor patogenicidad que de los otros tejidos. Las cepas no mostraron relación entre patogenicidad y origen geográfico (Tabla 1).

**Tabla 1.** Procedencia y patogenicidad de 72 cepas de *Ralstonia solanacearum* raza2, aisladas de cultivos de plátano, banano y heliconia.

Cepa No	Origen	Cultivo	Fuente	Patogenicidad		Hiper-sensibili-dad <sup>2</sup>
				ABCPE	Grupo <sup>1</sup>	
1	Quindío	Plátano	Raquis	18.00	2	+
2	Quindío	Plátano	Pecíolo	69.38	1	+
3	Quindío	Plátano	Pecíolo	49.00	1	+
4	Urabá (Antioquia)	Banano	Seudotallo	43.13	2	-
5	Urabá (Antioquia)	Banano	Rizoma	38.75	2	-
6	Urabá (Antioquia)	Banano	Fruto	31.83	2	-
7	Urabá (Antioquia)	<b>Banano</b>	Fruto	62.17	1	-
15	Quindío	Plátano	Suelo	37.63	2	+
17	Jamundí (Valle)	Plátano	Suelo	69.50	1	+
18	Jamundí (Valle)	<b>Plátano</b>	Colino	42.50	2	+
32	Caquetá	Plátano	Seudotallo	33.88	2	+
33	Caquetá	<b>Plátano</b>	Seudotallo	40.38	2	+
34	Caquetá	Plátano	Raquis	27.63	2	+
38	Quindío	<b>Plátano</b>	Suelo	59.50	1	+
39	Quindío	<b>Plátano</b>	Suelo	62.00	1	+
40	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Suelo	15.75	3	+
41	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Suelo	56.25	1	+
42	Fuente de Oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	28.00	2	+
43	Fuente de Oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	20.75	2	+
48	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto	37.13	2	+
54	Fuente de Oro (Meta)	<b>Plátano</b>	Seudotallo	36.25	2	+
55	Fuente de Oro (Meta)	<b>Plátano</b>	Seudotallo	55.25	1	+
57	Fuente de Oro (Meta)	<b>Plátano</b>	Seudotallo	45.63	1	+
58	Fuente de Oro (Meta)	<b>Plátano</b>	Seudotallo	56.63	1	+
59	Fuente de Oro (Meta)	<b>Plátano</b>	Seudotallo	0.00	3	+
60	Fuente de Oro (Meta)	<b>Plátano</b>	Seudotallo	47.25	1	+
63	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	50.69	1	+
64	Granada (Meta)	<b>Plátano</b>	Seudotallo	46.13	1	+
65	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	47.63	1	+
66	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	69.75	1	+
67	Fuente de Oro (Meta)	Plátano	Seudotallo	41.63	2	+
69	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	27.00	2	+
70	Granada (Meta)	Plátano	Seudotallo	5.75	3	+
71	Urabá (Antioquia)	Plátano	Rizoma	21.25	2	-
72	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo	10.75	3	-
73	Urabá (Antioquia)	Plátano	Seudotallo	10.75	3	-
76	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo	61.88	1	+
78	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis	73.38	1	+

Continuación de Tabla 1

Cepa No	Origen	Cultivo	Fuente	Patogenicidad		Hiper-sensibilidad <sup>2</sup>
				ABCPE	Grupo <sup>1</sup>	
79	Montenegro (Quindío)	Plátano	Rizoma	66.88	1	+
80	Montenegro (Quindío)	Plátano	Seudotallo	67.88	1	+
81	Montenegro (Quindío)	Plátano	Fruto	10.88	3	+
83	Quindío	Plátano	Fruto	55.00	1	+
84	Quindío	Plátano	Seudotallo	61.00	1	+
85	Quindío	Plátano	Colino	68.38	1	+
86	Calarcá (Quindío)	Plátano	Raquis	59.75	1	+
88	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Rizoma	61.75	1	+
89	La Tebaida (Quindío)	Plátano	Seudotallo	60.38	1	+
90	Montenegro (Quindío)	Plátano	Peciolo	19.25	2	-
91	Montenegro (Quindío)	Plátano	Raquis	19.38	2	+
92	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Peciolo	63.13	1	+
94	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Raquis	47.25	1	+
95	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Rizoma	65.63	1	+
96	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Seudotallo	33.00	2	+
97	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Rizoma	28.63	2	+
98	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Raquis	59.50	1	+
99	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Seudotallo	40.25	2	+
100	Armenia (Quindío)	Plátano	Colino	71.88	1	+
101	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo	58.50	1	+
102	Quimbaya (Quindío)	Plátano	Peciolo	1.38	3	+
104	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto	41.25	2	+
106	Armenia (Quindío)	Plátano	Seudotallo	24.75	2	+
107	Armenia (Quindío)	Plátano	Fruto	68.25	1	+
109	Armenia (Quindío)	Plátano	Peciolo	45.13	1	+
110	Magdalena	Banano	Seudotallo	63.25	1	+
111	Magdalena	Banano	Rizoma	34.38	2	+
112	Magdalena	Banano	Hijo	29.50	2	-
113	Palmira (Valle)	Heliconia	Seudotallo	40.50	2	+
114	Palmira (Valle)	Heliconia	Rizoma	40.38	2	+
115	Palmira (Valle)	Heliconia	Rizoma	33.63	2	+
160	Quindío	Plátano	Suelo	12.38	3	+
161	Quindío	Plátano	Suelo	1.75	3	+
588	Fuente de Oro (Meta)	Plátano	Peciolo	71.25	1	+
1008	Ibagué (Tolima)	Plátano		65.13	1	+
DMS <sub>α</sub> = 5%				28.33		

<sup>1</sup> Grupo de patogenicidad 1: patogenicidad alta; 2: patogenicidad media; 3: patogenicidad baja  
<sup>2</sup> +: Reacción de hipersensibilidad típica; -: Reacción atípica de amarillamiento

### **CONCLUSIONES**

1. La técnica de BIO-PCR facilitó la detección del patógeno en suelo y plantas.
2. Todas las cepas de *R. solanacearum* aisladas, corresponden al Biovar 1.
3. La patogenicidad de las cepas mostró variación de acuerdo con el cultivo y el tejido de donde se aisló.

### **AGRADECIMIENTOS**

A los doctores Ever Vargas; Huber Ancízar Salinas (ICA, Armenia), Dr. Aníbal Tapiero (CORPOICA, Villavicencio) y Dr. Luis Carlos Jiménez (SUNISA, Medellín), por el suministro de muestras de suelo y tejido.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) por la financiación de este proyecto.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- DENNY, T.P. HAYWARD, A.C. 2001.** Gram-negative Bacteria. páginas 151-173. *En*: Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Chun, W. (eds.). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society (APS). St Paul, MN, USA.
- GOSZCZYNSKA, T. SERFONTEIN, J. J. SERFONTEIN, S. 2000.** Introduction to Practical Phytobacteriology. First edition. Safrinet. Pretoria – South Africa. 83 p.
- HAYWARD, A. C. 1991.** Biology and Epidemiology of Bacterial wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology. 29, 64-87.
- HE, L.Y. SEQUEIRA, L. KELMAN, A. 1983.** Characteristics of Strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disease. 67 (12): 1357-1361.
- ITO, S. USHIJIMA, Y. FUJII, T. TANAKA, S. KAMEYA-IWAKI, M. YOSHIWARA, S. KISHI, F. 1998.** Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semiselective medium and PCR technique. Journal of Phytopathology. 146: 379 – 384.
- KELMAN, A. 1954.** The relationship of Pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to Colony Appearance on a Tetrazolium Medium. Phytopathology. 44: 693-695.
- LOZANO, J.C., SEQUEIRA, L. 1970.** Differentiation of Races of *Pseudomonas solanacearum* by a Leaf Infiltration Technique. Phytopathology 60: 833-838
- MARTINS, O. 2000.** Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Bacterial wilt, Caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Georg-August University, Gottingen, Germany. 127 p.
- SEAL, S. E. TAGHAVI, M. FEGAN, N. HAYWARD, A. C. FEGAN, M. 1999.** Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rADN Subgroups by PCR test. Plant Pathology 48: 115 – 120.